



Contributo para a caracterização de azeites virgens produzidos na região do Douro

Liliana Raquel dos Santos Ferreira

*Dissertação apresentada à Escola Superior Agrária de Bragança para
obtenção do Grau de Mestre em Qualidade e Segurança Alimentar*

Orientado por

Professor Doutor Albino António Bento

Professor Doutor José Alberto Cardoso Pereira

Bragança

2014

Aos meus Pais

Ao meu Irmão

AGRADECIMENTOS

A realização desta Dissertação de Mestrado só foi possível graças à colaboração e ao contributo, de forma direta ou indireta, de várias pessoas às quais gostaria de exprimir algumas palavras de agradecimento e profundo reconhecimento, em particular:

Em primeiro lugar gostaria de agradecer aos meus orientadores. Ao Professor Doutor José Alberto Pereira, pela ajuda na colaboração deste trabalho, pela exigência e rigor, pela orientação científica e pelo seu carisma e sentido de humor que o caracterizam.

Ao Professor Doutor Albino Bento, da Escola Superior Agrária, pela sua simpatia, disponibilidade e esforço para garantir condições materiais e financeiras para o bom desenvolvimento deste trabalho.

Aos docentes do Mestrado em Qualidade e Segurança Alimentar, da Escola Superior Agrária de Bragança, o meu muito obrigado pelos saberes que me foram transmitidos.

À Professora Doutora Susana Casal, do Serviço de Bromatologia da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto, por todo o auxílio prestado na determinação da composição em ácidos gordos e tocoferóis e esteróis e pela sua constante disponibilidade e simpatia.

Aos meus colegas de laboratório, Nuno Rodrigues e Ricardo Malheiro, pela perseverança, pelo apoio, incentivo, auxílio e conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho.

Aos meus pais, é com grande alegria e gratidão que lhes dedico esta minha vitória.

ÍNDICE

1.	INTRODUÇÃO.....	3
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	7
2.1.	COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO AZEITE	7
2.2.1	<i>Fração Maioritária.....</i>	7
2.2.2	<i>Fração Minoritária</i>	9
2.2.	PRODUTOS DE QUALIDADE QUALIFICADOS	18
2.2.1	<i>DOP's Portuguesas de Azeite.....</i>	20
3.	MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1.	AMOSTRAGEM.....	27
3.2.	PARÂMETROS DE QUALIDADE	27
3.7.1.	<i>Acidez</i>	27
3.7.2.	<i>Índice de Peróxido</i>	28
3.7.3.	<i>Espectrofotometria no Ultravioleta</i>	28
3.3.	ÁCIDOS GORDOS	29
3.4.	TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS	30
3.5.	TEOR EM FENÓIS TOTAIS	31
3.6.	ESTERÓIS.....	32
3.7.	ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES	32
3.7.1.	<i>Atividade Sequestradora do Radical DPPH (DPPH[•])</i>	32
3.7.2.	<i>Atividade Sequestradora do Radical ABTS (ABTS^{•+})</i>	33
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1.	PARÂMETROS DE QUALIDADE.....	37
4.2.	COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS.....	40
4.3.	COMPOSIÇÃO EM TOCOFERÓIS	45

4.4.	TEOR EM FENÓIS TOTAIS	47
4.5.	ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES.....	49
4.5.1.	<i>Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH•).....</i>	49
4.5.2.	<i>Atividade Sequestradora do radical ABTS (ABTS•+).....</i>	50
4.6.	AVALIAÇÃO DO PERFIL EM ESTERÓIS	51
5.	CONCLUSÕES.....	57
6.	BIBIOGRAFIA	60

Índice de Figuras

Figura 1: Representação esquemática da formação do triglicérido.	9
Figura 2: Estrutura dos hidrocarbonetos terpénicos: a, esqualeno; b, β -caroteno. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.	10
Figura 3: Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis.....	11
Figura 4: Álcoois fenólicos presentes no azeite: a, hidroxitirosol; b, tirosol. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.	12
Figura 5: Principais secoiridóides do azeite: a, oleuropeína; b, ligstrosídeo. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.	13
Figura 6: Estrutura das flavonas presentes no azeite: a, luteolina; b, apigenina. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.	13
Figura 7: Linhanas presentes no azeite: a, 1- pinoresinol; b, 1-Acetoxipinoresinol. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.	13
Figura 8: Estrutura química da clorofila (a e b).....	15
Figura 9: Estrutura química de alguns carotenóides presentes em azeites.....	15
Figura 10- DOP's Portuguesas de Azeite	21
Figura 11 – Valores médios do perfil em ácidos gordos saturados das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. 1. Quinta do Vallado; 2. Quinta do Noval; 3. Quinta do Noval Cordovil; 4. Real Companhia; 5. Vale D. Maria I; 6. Herdade Verdeal; 7. Herdade Cobra; 8. Herdade Madural; 9. João Nápoles.....	39
Figura 12 – Valores médios do perfil em ácidos gordos monoinsaturados das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. 1. Quinta do Vallado; 2. Quinta do Noval; 3. Quinta do Noval Cordovil; 4. Real Companhia; 5. Vale D. Maria I; 6. Herdade Verdeal; 7. Herdade Cobra; 8. Herdade Madural; 9. João Nápoles.....	40
Figura 13 - Valores médios do perfil em ácidos gordos polinsaturados das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. 1. Quinta do Vallado; 2. Quinta do Noval; 3.	

Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.....41

Figura 14 – Valores médios do teor total em tocoferóis (Vitamina E Total), em mg/Kg, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.....43

Figura 15 – Valores médios do teor em fenóis totais, em mg CAE/Kg de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.....44

Figura 16 - Valores médios da atividade bloqueadora do radical DPPH, em $\mu\text{mol/mL}$ de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.....45

Figura 17 - Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS, em mg mmol Trolox/mL de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.....46

Figura 18 - Valores médios do total de esteróis, em mg/kg de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.....49

Índice de Quadros

Quadro 1: Limites estabelecidos para a composição em ácidos gordos do azeite. ...**Erro!**

Marcador não definido.

Quadro 2: Limites da composição esterólica em azeites. 17

Quadro 3: Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O₂/Kg); K₂₃₂; K₂₇₀ e ΔK] do azeite (média ± desvio padrão). 37

Quadro 4: Perfil em ácidos gordos, em percentagem média ± desvio padrão, das diferentes amostras de azeites avaliadas. 42

Quadro 5: Valores médios do teor em tocoferóis, expressos em mg/kg de azeite, das amostras de azeite provenientes da região do Douro (média ± desvio padrão). ... 46

Quadro 6: Valores médios dos Esteróis Totais..... 52

Resumo

A região do Douro é tradicionalmente conhecida como grande produtora de vinho do Porto e de vinhos de qualidade. Nos últimos anos, alguns dos produtores, no sentido de aproveitar o marketing associado à região, começaram a embalar azeites produzidos nessa área geográfica. Neste sentido, e uma vez que não existia até ao momento nenhuma referência à composição dos azeites produzidos no vale do Douro, foi objetivo deste trabalho proceder a uma caracterização preliminar em termos de qualidade, composição química e atividade antioxidante de diferentes amostras de azeites produzidos nesta região.

Os resultados indicam que as diferentes amostras avaliadas são de excelente qualidade, em que os valores dos parâmetros de qualidade (acidez, índice de peróxido e coeficientes de extinção específica no ultravioleta) se encontravam muito abaixo dos máximos estabelecidos para a categoria de azeite virgem extra.

A composição em ácidos gordos e esteróis, ainda que com grande variação entre amostras, encontram-se dentro das gamas de valores normais para azeite. Por sua vez, o teor em tocoferóis apresenta valores muito superiores aos azeites produzidos na região de Trás-os-Montes, o que pode ser um fator distintivo característico dos azeites do Douro. Foi também observado uma elevada capacidade de sequestro de radicais de DPPH, indicativo do elevado valor biológico destes azeites. Os resultados obtidos, ainda que preliminares, são um passo importante para a caracterização dos azeites da região, no entanto dever-se-á proceder à análise de um maior número de amostras, provenientes de toda a região e de anos de produção distintos para uma melhor caracterização dos azeites do Vale do Douro.

Palavras-chave: Azeite, região do Douro, qualidade, ácidos gordos, esteróis, tocoferóis, atividade antioxidante.

Abstract

The Douro region is traditionally known as a major producer of Port wine and quality wines. In recent years, some of the producers, in order to take advantage of the marketing associated with the region began to pack olive oils produced in that geographical area. In this sense, and since there was so far no reference to the composition of oils produced in the Douro valley, the aim of this study was to undertake a preliminary characterization in terms of quality, chemical composition and antioxidant activity of different samples of olive oils produced in this region. The results indicated that the different samples tested were of excellent quality, in which the values of the quality parameters (acidity, peroxide value and coefficients of specific extinction at ultraviolet) were far below the maximum limits for the category of extra virgin olive oil.

The composition of fatty acids and sterols, even with high variation between samples, are within the normal ranges of values for olive oil. In turn, the content of tocopherols showed much higher values than those of olive oils produced in the region of Trás-os-Montes, which can be a characteristic distinguishing factor of the Douro olive oils. It was also observed a high sequestration capacity of DPPH radical, indicative of high biological value of these oils. The results, although preliminary, are an important step for the characterization of olive oils of the region, however it will should proceed to analysis of a larger number of samples from across the region and years of production for a better characterization of olive oils from the Douro Valley.

Keywords: Olive oil, Douro region, quality, fatty acids, sterols, tocopherols, antioxidant activity.

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO

O azeite, extraído do fruto da oliveira (*Olea europaea* L.), é de todos os óleos vegetais comestíveis, aquele que goza de maior tradição, que é usado à mais tempo e um dos mais valorizados comercialmente. Este óleo, tem a particularidade de ser um óleo virgem, que é consumido cru, conservando desta forma toda a sua composição e riqueza naturais.

A Bacia Mediterrânica é por excelência a região produtora de azeite, sendo aí que se concentra a maior parte do património olivícola mundial, e que representa uma enorme importância na economia rural, no meio ambiente e na fixação de populações em territórios de baixa densidade como são algumas dessas regiões.

Ao nível da produção, representando cerca de 80% da produção mundial, e do consumo, com aproximadamente 70% de azeite do azeite consumido, a União Europeia é o maior produtor e consumidor mundial (De Lacroix, 2003).

As excelentes condições edafoclimáticas de Portugal tornaram a olivicultura numa cultura estratégica para a agricultura portuguesa, ocupando a oitava posição no ranking mundial dos produtores de azeite. As suas principais regiões de produção são o Alentejo e Trás-os-Montes (MADRP, 2007), mas devido a um clima mais favorável, menor ataque de pragas e doenças, e à utilização de diferentes cultivares de oliveira, Trás-os-Montes, é tradicionalmente, a região com a melhor qualidade do azeite no País.

Trás-os-Montes e Alto Douro, possui um rico património oleícola, com a existência de um número considerável de cultivares de oliveira, das quais parte se encontram por caraterizar, no entanto merecem destaque as cultivares Cobrançosa, Madural, Verdeal Transmontana e a Cordovil, que são a base de produção do azeite com Denominação de Origem Protegida (DOP) “Azeite de Trás-os-Montes”. Este azeite caracteriza-se por ser equilibrado, com cheiro e sabor a frutos frescos, por vezes amendoado, e com uma sensação notável de doce, verde, amargo e picante.

Apesar da qualidade conhecida dos azeites da região, a área de produção da oliveira em Trás-os-Montes e Alto Douro, é vasta e estende-se desde o vale do Douro

até aos concelhos de Bragança e Vinhais, zonas agroclimaticamente muito distintas, com cultivares de oliveira também diferentes, e que produzem azeites com características químicas e sensoriais diferentes. Neste sentido, a caracterização dos azeites provenientes de diferentes áreas geográficas da região é um aspeto da maior importância.

Nos últimos anos, a região do Douro, tem apostado na produção de azeite, ainda que a uma escala reduzida, têm aparecido na região azeites de elevada qualidade, bem pontuados nos concursos nacionais e internacionais, e que interessa caracterizar. Neste sentido com o presente trabalho pretendeu-se proceder a uma caracterização preliminar dos azeites produzidos no Vale do Douro, nomeadamente em termos de características de qualidade, composição química e atividade antioxidante de diferentes amostras provenientes da região.

Capítulo II

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Composição Química do Azeite

O azeite é um alimento rico, na sua composição predominam sobretudo os ácidos gordos monoinsaturados, onde predomina o oleico, e um conjunto de outros componentes menores (Gunstone, 2002; Gutierrez et al., 2009).

Há um conjunto grande de fatores que interferem ao nível da sua composição e qualidade como sejam as condições climáticas, as variedades utilizadas e o estado de maturação no momento da colheita (Conde et al., 2008).

Do ponto de vista químico, o azeite é constituído por duas frações, uma maioritária, a fração saponificável, e uma minoritária, a fração insaponificável (Firestone, 2005). A fração maioritária, variável entre 98,5% e 99,5%, constituída essencialmente por triglicéridos e, em menor dimensão, por ácidos gordos livres e outros glicéridos parciais (Boskou et al., 2006). A sua fração minoritária é constituída por hidrocarbonetos; tocoferóis; compostos fenólicos; fosfolípidos; ceras; clorofilas e carotenóides; álcoois alifáticos e triterpénicos; esteróis e compostos voláteis e aromáticos. Devido à sua elevada especificidade, os componentes minoritários são muitas vezes usados como critério de qualidade e de autenticidade (Boskou, 1998; Garcia et al., 2005; Jiménez et al., 2001).

2.2.1 *Fração Maioritária*

Ácidos Gordos e Triglicerídeos

O azeite é maioritariamente constituído por ácidos gordos monoinsaturados de onde predomina o oleico seguido de outros ácidos gordos como o ácido palmítico (C16:0), linoleico (C18:2), esteárico (C18:0) e palmitoleico (C16:1), e alguns em quantidades menores como o linolénico (C18:3), araquídico (C20:0), eicosenóico

(C20:1), margárico (C17:0), beénico (C22:0), lignocérico (C24:0), e mirístico (C14:0) (Sánchez et al., 2001) (Quadro 1.).

Grande parte dos ácidos gordos existentes no azeite encontra-se esterificada em conjuntos de três ácidos gordos com uma molécula de glicerol formando um triacilglicerol ou triglicérido (Figura 1), que são os componentes principais da fracção saponificável.

Quadro 1: Limites estabelecidos para a composição em ácidos gordos do azeite.

Ácidos Gordos (AG)	Limite (% do total de AG)
Mirístico	$\leq 0,03$
Palmítico	7,5-20
Palmitoleico	0,3-3,5
Heptadecanóico	$\leq 0,03$
Esteárico	0,5-5,0
Oleico	55-83
Linoleico	3,5-21
Linolénico	$\leq 1,0$
Araquídico	$\leq 0,6$
Eicosenóico	$\leq 0,4$
Beénico	$\leq 0,2^*$
Lignocérico	$\leq 0,2$

(% m/m ésteres de metilo); Fonte: Reg. 1989/2003.

* O limite aumenta para $\leq 0,3$ no caso dos óleos de bagaço de azeitona

Atendendo ao número de ácidos gordos presentes no azeite, existem inúmeras combinações possíveis para os triglicéridos. No entanto, nem todos podem ser encontrados neste óleo vegetal, já que alguns existem em quantidades desprezáveis e outros nem sequer estão presentes (Boskou, 1998). Nos triglicéridos o ácido gordo maioritário é o ácido oleico (O) (55-83%), contém ainda ácido palmítico (P), esteárico (S), linoleico (L) e linolénico (Ln), bem como outros em quantidades vestigiais. Os

teores de ácidos gordos saturados e polinsaturados são da ordem dos 6 e 15%, respectivamente. Os triacilgliceróis mais abundantes são: OOO, POO, LOO, SOO, POL, o que está em conformidade com a sua riqueza em ácido oleico (Cunha et al., 2006)

Quando ocorrem reações de hidrólise dos triacilgliceróis, ou quando ocorre biossíntese incompleta de triacilgliceróis, verifica-se a ocorrência de mono e diglicéridos (Kiritsakis & Christie, 2000). No azeite virgem, a concentração de diacilgliceróis varia entre 1 e 2,8% enquanto os monoacilgliceróis estão presentes em teores inferiores a 0,25% (Boskou et al, 2006).

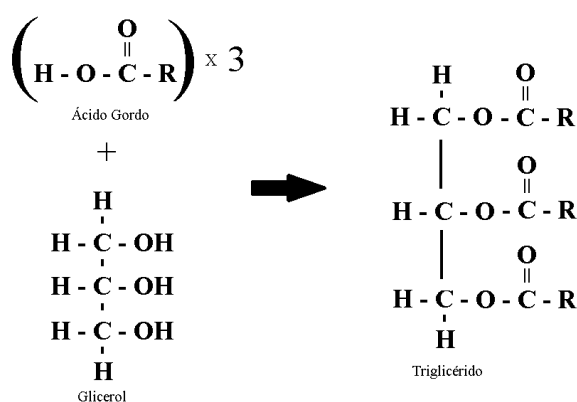


Figura 1: Representação esquemática da formação do triglicérido.

2.2.2 Fração Minoritária

Hidrocarbonetos

Os hidrocarbonetos são os constituintes principais da fração insaponificável, representando cerca de 32-50% desta fração (Boskou, 1998). Estes podem ser de natureza terpénica, esteróica ou policíclica aromática (Sánchez et al., 2001). O esqualeno e o β -caroteno são os hidrocarbonetos terpénicos mais abundantes no azeite, estando a sua estrutura química esquematizada na figura 2 (Boskou et al., 2006).

O esqualeno é formado por 30 carbonos ($C_{30}H_{50}$), é o produto intermédio da biossíntese do colesterol e precursor dos triterpenos e dos fitosteróis (Boskou, 1996) e representa 40% do peso total da fração insaponificável (Sánchez et al., 2001) e 90% dos hidrocarbonetos (Boskou et al., 2006).

O β -caroteno é um terpeno de 40 átomos de carbono com concentrações de 0,5 a 4 mg/kg de azeite, que conferem aos alimentos de origem vegetal cores que vão do amarelo ao vermelho (Sánchez et al., 2001).

Os hidrocarbonetos de natureza esterólica encontram-se em quantidades inferiores a 0,5 mg/kg de azeite, sendo que a sua presença é associada a processos de refinação. O estigmastadieno é o composto mais significativo formado pelos processos de refinação a partir do β -sitosterol (Sánchez et al., 2001). Os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são muito residuais (1 a 700 $\mu\text{g/kg}$) (Tiscornia et al., 1982).

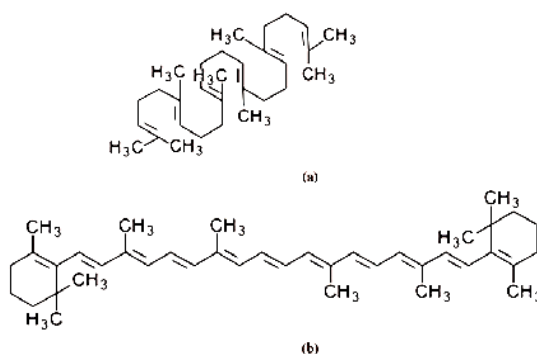


Figura 2: Estrutura dos hidrocarbonetos terpénicos: a, esqualeno; b, β -caroteno. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.

Tocoferóis e Tocotrienóis

Os tocoferóis e tocotrienóis são compostos lipofílicos, definem um carácter vitamínico e caracterizam-se particularmente pela sua elevada atividade antioxidante (figura 3). Como antioxidantes estes compostos vão retardar ou até mesmo impedir a oxidação, contribuindo para a estabilidade do azeite (Aparício & Harwood, 2003).

Os tocoferóis e os tocotrienóis diferenciam-se entre si pelo número e posição de grupos metilo no anel aromático. Assim existem compostos designados por α -, β -, γ - e δ -, o composto que predomina é o α -tocoferol, sendo que este representa cerca de 95% do total da vitamina E no azeite (Tasiqula- Margari et al., 2001). Fatores como a cultivar, fatores agronômicos e também tecnológicos podem alterar a sua composição. A concentração dos tocoferóis pode variar entre os 125 e 300 mg/kg (Boskou, 1998; Aparício & Harwood, 2003) os valores referenciados para um azeite de boa qualidade são superiores a 100 mg/kg (Belitz et al., 2009).

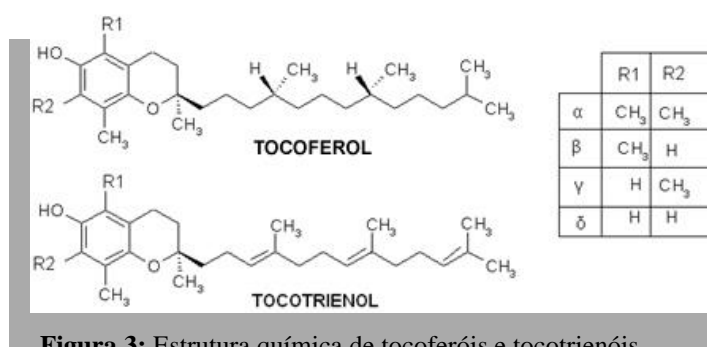


Figura 3: Estrutura química de tocoferóis e tocotrienóis.

Compostos Fenólicos

O azeite é o único óleo vegetal onde se encontra quantidades consideráveis de substâncias fenólicas naturais, contém antioxidantes que afetam de forma significativa a sua estabilidade, sabor e aroma (Boskou, 1996). A composição fenólica do azeite é bastante complexa e nem todos os componentes são identificados (Calabrese, 2002), já a sua concentração pode variar em função da variedade, estado de maturação e processos de elaboração (Boskou, 2008).

Estes compostos encontram-se divididos em diferentes categorias, tais como os ácidos e álcoois fenólicos, secoiridóides, flavonas e lignanas. O grupo dos ácidos

fenólicos, está presente em pequenas quantidades, e divide-se em dois tipos, benzóico e cinâmico. Quanto ao grupo dos álcoois fenólicos é composto maioritariamente pelo hidroxitirosol e tirosol (figura 4). Os secoiridóides, juntamente com as lignanas, são os mais abundantes no azeite virgem extra, tem uma estrutura semelhante à da oleuropeína (figura 5). A oleuropeína é o principal composto fenólico da azeitona (Tuck & Hayball, 2002), responsável pelo amargor das azeitonas verdes (Boskou, 1998). Os flavonoides são subdivididos em chalconas, flavonas, flavanonas flavonóis, diidroflavonóis, isoflavonas, antocianinas e antocianidinas, e auronas. Podem ser encontradas diferentes tipos de flavonas, tais como a apigenina ou luteolina (figura 6) (Servili et al., 2004). Relativamente às lignanas, foram identificado especificamente dois compostos, pinoresinol e acetoxipinoresinol (figura 7). A quantidade de lignanas presentes no azeite virgem pode ser de até 100 mg / kg de azeite (Owen et al., 2000). Os elevados níveis da fracção fenólica confere ao azeite uma elevada estabilidade e um sabor frutado forte (Visioli et al., 2006).



Figura 4: Álcoois fenólicos presentes no azeite: a, hidroxitirosol; b, tirosol. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.

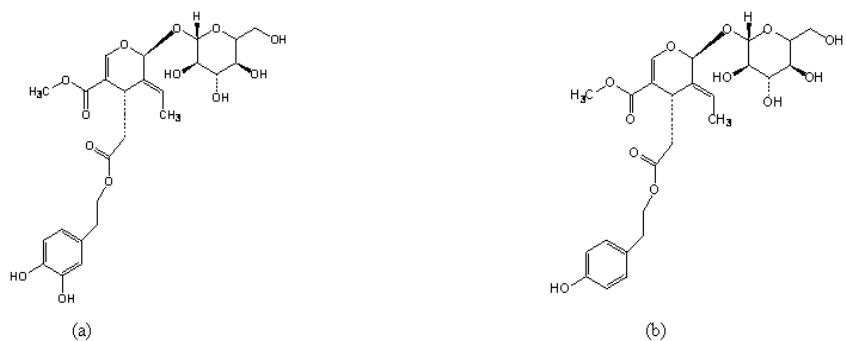


Figura 5: Principais secoiridóides do azeite: a, oleuropeína; b, ligstrosídeo. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.



Figura 6: Estrutura das flavonas presentes no azeite: a, luteolina; b, apigenina. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.



Figura 7: Lignanas presentes no azeite: a, 1- pinoresinol; b, 1-Acetoxipinoresinol. Fonte: Gutiérrez & Carretero, 2009.

Fosfolípidos

Os principais fosfolípidos encontrados no azeite são: a fosfatidilcolina, a fosfatidiletanolamina, o fosfatidilinositol e a fosfatidilserina, com teores que oscilam entre 40 a 135 µg/g de azeite (Boskou, 1998). Os fosfolípidos em união com os compostos fenólicos e os tocoferóis contribuem para melhorar a sua capacidade antioxidante (Hudson & Ghovami, 1984). O ácido oleico é o ácido gordo que se destaca na estrutura dos fosfolípidos (Sánchez et al., 2001).

Ceras

As ceras são ésteres de álcoois alifáticos de cadeia longa, de elevado ponto de fusão, com cerca de 58 átomos. O teor de ceras no azeite é, normalmente, muito baixo, tendo um limite máximo estabelecido de 350 mg/kg de azeite (COI, 2008).

É usual serem caracterizadas pelo número total de carbonos. As principais ceras detectadas nos azeites são esteres de ácido oleico ou palmítico de C36 a C46 átomos de carbono (Reiter & Lorbeer, 2001).

Diversos fatores, entre os quais, o seu elevado peso molecular, o seu ponto de fusão superior a 70°C, entre outros, podem influenciar as suas propriedades físicas. (Ramírez-Tortosa et al., 2006). O seu teor também pode ser afetado por fatores, como a cultivar, ano de colheita, qualidade da matéria-prima e condições de processamento (Boskou et al., 2006).

Clorofilas e Carotenóides

Os carotenóides em união com as clorofilas contribuem não só para a coloração do azeite como também para a sua atividade antioxidante. Segundo autores a cor do azeite é um dos requisitos básicos para avaliar a sua qualidade, mas ainda não existe nenhum método padronizado para a sua devida avaliação (Boskou et al., 2006; Sanchez et al., 2001). O azeite virgem tem um espectro de cores que varia desde o amarelo

esverdeado até ao dourado, a cor do pigmento altera dependendo da variedade e do grau de maturação do fruto (Boskou, 1998).

Os componentes responsáveis por esta característica no azeite dividem-se em duas classes de pigmentos naturais: as clorofilas a e b (figura 8), responsáveis pela cor esverdeada, e os carotenóides, representados na figura 9, responsáveis pela cor amarelada dos azeites (Gutiérrez & Carretero, 2009). A luteína, o β -caroteno, violaxantina e neoxantina são carotenóides que vinculam no azeite com uma concentração que varia entre 1 e 20 ppm (Morelló et al., 2004).

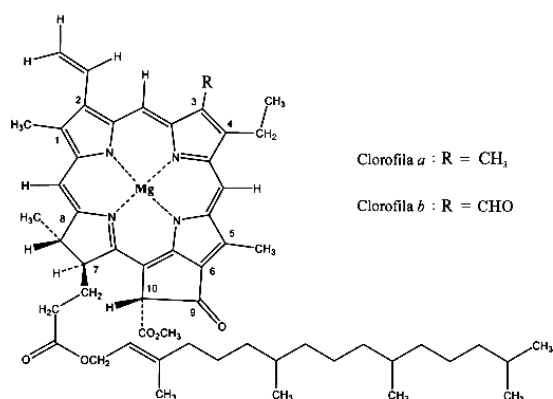


Figura 8: Estrutura química da clorofila (a e b).

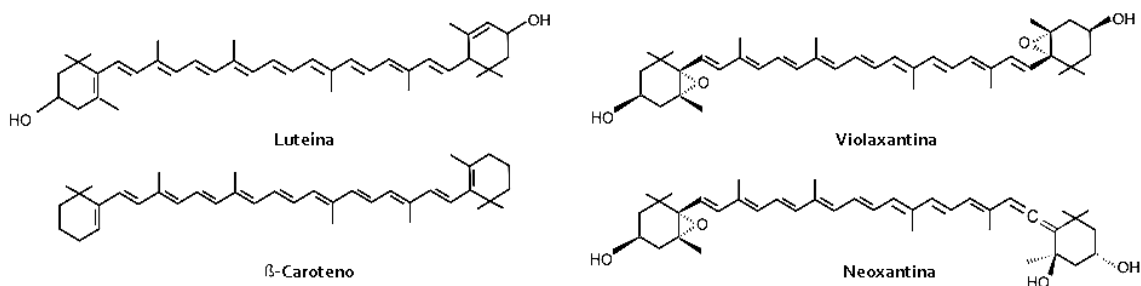


Figura 9: Estrutura química de alguns carotenóides presentes em azeites.

Álcoois Alifáticos e Terpénicos

Os álcoois alifáticos podem ser utilizados como critério de diferenciação de vários tipos de azeite evidenciando se como uma importante classe da fração minoritária (Boskou, 1996). Os álcoois gordos e os álcoois diterpénicos são considerados como os mais importantes, encontrando-se na forma livre e esterificada. Relativamente aos álcoois gordos presentes no azeite destacam-se, o dicosanol (C22), tetracosanol (C24), hexacosanol (C26) e octacosanol (C28) (Sánchez et al., 2001). Quanto aos álcoois diterpénicos os que predominam no azeite é o fitol e o geranilgeraniol (Boskou, 1998). Os álcoois triterpénicos variam de 500 a 3000 mg/kg, sendo identificados como principais álcoois triterpénicos o eritrodiol e uvaol (Ramírez-Tortosa et al., 2006).

Esteróis

A fracção esterólica é um dos elementos de identidade do azeite, essencial para a garantia da sua qualidade e genuinidade. O principal esterol presente no azeite é o β -sitosterol representa cerca de 90-95% do total dos esteróis, constituindo o campesterol e o estigmasterol (Belitz et al., 2004). Em níveis significativos mas com concentrações relativamente baixas, predominam alguns esteróis, entre os quais, o estigmasterol, colesterol, 24-metileno-colesterol, Δ^7 -campesterol, Δ^{5-23} -estigmastadienol, clerosterol, sitostanol, Δ^{5-24} -estigmastidienol, Δ^7 -estigmastenol e Δ^7 -avenasterol (Sánchez et al., 2001). Os diversos esteróis da natureza diferem no número e posições das duplas ligações e na natureza da cadeia lateral (Gutiérrez & Carretero, 2009). Segundo o Regulamento Europeu n.º 1989/2003, cada componente deverá existir dentro dos limites estabelecidos, indicados no quadro 2.

Quadro 2: Limites da composição esterólica em azeites.

Esteróis	Limites (% do total de esteróis)
Colesterol	$\leq 0,5$
Brassicasterol	$\leq 0,1$
Campesterol	$\leq 4,0$
Estigmasterol	$< \text{Campesterol}$
Δ -7-estigmasterol	$\leq 0,5$
β -sistotol + Δ -5-avenasterol+ Δ -5,23-estigmastadienol+ Clerosterol+ Sistostanol+ Δ -5,24-estigmastadienol	$\geq 93,0$
Esteróis Totais (mg/kg)	≥ 1

Compostos Voláteis e Aromáticos

O Azeite tem a capacidade de demonstrar um aroma destinto que o vai diferenciar de todos os outros óleos alimentares, essa especificidade deve-se à grande quantidade de compostos aromáticos de diversa natureza que este contém. Estes compostos voláteis que definem esta característica peculiar desenvolvem-se durante e após a extracção (Kalua, et al., 2007).

Os azeites contêm aproximadamente 280 compostos voláteis, entre os quais hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres, éteres, derivados de furano, derivados de tiofeno, piranonas, tióis e um composto de pirazina. Nem todos os compostos voláteis são responsáveis pelo aroma dos azeites devido às suas baixas concentrações, torna-se difícil serem detetados (Boskou et al., 2006).

2.2. Produtos de Qualidade Qualificados

Atualmente verifica-se cada vez mais patente uma preocupação do consumidor relativo à origem dos produtos alimentares que adquire. A exigência e a sofisticação a pedido dos mesmos desafiaram, os produtores ao aperfeiçoamento das técnicas de produção e de elaboração dos seus produtos. Do esforço dos produtores resultaram menções reconhecidas que atualmente se aplicam aos produtos tradicionais portugueses com o reconhecimento de qualidade, de prestígio ou de tradição. De modo a garantir a autenticidade dos produtos, é importante evitar possíveis misturas ou substituições dos materiais brutos e de elaborar métodos eficazes para permitir o controlo das cultivares utilizadas durante o processamento do material (Pasqualone et al., 2007).

Foram desencadeadas ações e implementadas medidas de apoio, relativamente à valorização dos produtos tradicionais, garantia da sua qualidade, da sua origem, da sua origem geográfica, da sua tradicionalidade ou dos modos particulares de produção, com vista à respetiva certificação.

Por essa razão a comunidade europeia criou, sistemas de proteção e de valorização dos produtos agroalimentares, designadamente: denominação de origem protegida (DOP), indicação geográfica protegida (IGP) e especialidade tradicional garantida (ETG).

Esses regimes de qualidade tem que ser submetidos a um sistema de acompanhamento mediante controlos oficiais, nos termos dos princípios previstos no Regulamento (CE) nº 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho, de 29 de abril de 2004, relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais e que incluam um sistema de inspeções em todas as fases de produção, transformação e distribuição (Regulamento (CE) nº 1151/2012), e que cumpram as regras enumeradas num caderno de especificações (Regulamento (CE) nº 510/2006 (MADRP 2007).

O Regulamento (CE) nº 510/2006 do conselho de 20 de Março de 2006 relativo à proteção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios define:



Denominação de Origem Protegida (DOP): o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício: originário dessa região, desse local determinado ou desse país, cuja qualidade ou características se devem essencial ou exclusivamente a um meio geográfico específico, incluindo os fatores naturais e humanos, e cuja produção, transformação e elaboração ocorrem na área geográfica delimitada.



Indicação Geográfica Protegida (IGP): o nome de uma região, de um local determinado ou, em casos excepcionais, de um país, que serve para designar um produto agrícola ou um género alimentício originário dessa região, desse local determinado ou desse país, e que possui determinada qualidade, reputação ou outras características que podem ser atribuídas a essa origem geográfica, e cuja produção e/ou transformação e/ou elaboração ocorrem na área geográfica delimitada.



Especialidade Tradicional Garantida (ETG): produto agrícola ou género alimentício produzido a partir das matérias-primas tradicionais, ou com uma composição tradicional ou um modo de produção e/ou de transformação que dependa do tipo de produção e/ou de transformação tradicional e que seja reconhecido como tal, conforme regulamentarmente previsto, através da obtenção de um Certificado de Especificidade (CE).

2.2.1 DOP's Portuguesas de Azeite

Em Portugal os esforços de valorização de denominações e indicações de origem de produtos tradicionais resultaram na criação de denominações protegidas. Praticamente por todo o território nacional encontram-se diversos produtos protegidos, entre eles, os azeites, registando-se, no entanto, uma maior incidência de produtos nas regiões do interior. Na atualidade, em território nacional, existem seis regiões de azeite DOP, são eles o “Azeite de Trás-os-Montes”, “Azeite da Beira Alta”, “Azeite da Beira Baixa”, “Azeite do Ribatejo”, “Azeite do Norte Alentejano”, “Azeite do Alentejo Interior” e “Azeite de Moura” (MADRP, 2007). Esta certificação baseia-se em características agroecologias dessas áreas e no uso das cultivares locais.



Figura 10- DOP's Portuguesas de Azeite

Azeite de Trás-os-Montes

A DOP de Trás-os-Montes inicia-se no distrito de Bragança, onde predomina o cultivo da variedade Negrinha de Freixo e estende-se por Alfandega da Fé, Vila Flor até Valpaços e Murça, passando por Mirandela. No clima e nos solos de xisto da Terra Quente, as azeitonas Madural, Cobrançosa e Verdeal Transmontana são responsáveis por azeites muito finos e complexos, com odores acentuados de frutos secos. Sendo azeites equilibrados, apresentam uma sensação notável de doce, verde, amargo e picante.

Azeite da Beira Alta

Na Sub-Região dos Azeites da Beira Alta, que confina com o rio Douro, as variedades Carrasquenha, Cobrançosa, Carrasquinha e Cornicabra originam azeites de

cor amarela, levemente esverdeada a amarela. Tem um aroma “*sui generis*” e sabor a frutos.

Azeite da Beira Baixa

Nesta região, a variedade Galega Vulgar junta-se à Bical e à Cordovil de Castelo Branco, dando origem a azeites complexos de aroma e sabor.

Azeite do Ribatejo

Na região do Ribatejo, a variedade que predomina é a Galega Vulgar, aliando-se à Lentisca apenas em Torres Novas. A área geográfica de produção, de solo calcário e clima mediterrânico é bem adaptada ao cultivo da oliveira. Esta é a região dos azeites doces. São ligeiramente espessos, frutados e com cor amarelo ouro, por vezes ligeiramente esverdeados.

Azeite do Norte Alentejano

Provenientes de algumas freguesias de Évora e dos concelhos de Estremoz, Borba e Reguengos de Monsaraz até Elvas, Campo Maior e Portalegre, os azeites do Alto Alentejo têm baixa e muito baixa acidez. São azeites, ligeiramente espessos frutados, com cor amarelo ouro, por vezes ligeiramente esverdeada, perfume e gosto suave, bem característico, e agradável ao paladar. Estes azeites são obtidos por processos mecânicos, a partir de azeitonas com elevada percentagem das variedades Galega, Blanqueta e Cobrançosa, dominando a Galega.

Azeite do Interior

Na região dos azeites do Interior, existem condições de solo e clima muito particulares, resultando num ambiente natural que favorece o desenvolvimento da oliveira. É uma região com uma gama de solos variada, todos ricos em cálcio e potássio, que influencia o porte e a produção de azeitona. O azeite apresenta cor amarela dourada

ou esverdeada, aroma frutado suave de azeitona madura e/ou verde e outros frutos, maçã e/ou figo, nomeadamente, transmitindo uma forte sensação adocicada.

Azeite de Moura

O azeite desta região é proveniente das variedades Cordovil de Serpa, Galega Vulgar e Verdeal Alentejana, resulta num azeite muito frutado, amargo e picante, sendo de cor amarelo-esverdeada.

Capítulo III

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostragem

No presente trabalho utilizaram-se nove amostras de azeites distintos, Quinta do Vallado, Quinta do Noval, Quinta do Noval Cordovil, Real Companhia, Vale D. Maria, Herdade Verdeal, Herdade Cobra, Herdade Madural e João Nápoles todos eles com o objetivo de caracterizar os azeites produzidos na região do Douro. Antes de se proceder à determinação dos diferentes parâmetros em avaliação, cada azeite foi filtrado com papel de filtro na presença de sulfato de sódio anidro, de forma a remover possíveis impurezas e humidade que pudessem estar presente. Após filtração, as amostras foram acondicionadas à temperatura de refrigeração em garrafas de cor âmbar de modo a evitar a ocorrência de fenómenos oxidativos, decorrendo as análises no menor período de tempo possível. Cada uma das determinações foi efetuada em triplicado de acordo com o procedimento analítico em questão.

3.2. Parâmetros de Qualidade

3.2.1. Acidez

A determinação da acidez foi executada de acordo com o anexo II do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991, com a seguinte metodologia: a toma de amostra para cada ensaio foi de, aproximadamente, 3,0 g, independentemente da acidez presumida; num matraz, a solução etanol/éter (1:1) etílico e as tomas de azeite foram tituladas com uma solução de hidróxido de sódio 0,1 M, utilizando como indicador uma solução de fenolftaleína, até aparecimento de cor rosada ténue e persistente. A acidez, em percentagem de ácido oleico livre na amostra, foi determinada utilizando a seguinte equação:

$$Acidez (\%) = \frac{V \times C \times M}{10 \times m}$$

onde:

V - volume de hidróxido de sódio gasto na titulação (mL);

C - concentração exata da solução de hidróxido de sódio em moles por litro;

M - massa molar do ácido oleico em g/mol;

m - massa da amostra em grama.

3.7.2. *Índice de Peróxido*

A determinação do índice de peróxido decorreu de acordo com o anexo III do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991, com a seguinte metodologia: cada toma de amostra, de aproximadamente 1,2 g, foi dissolvida em ácido acético glacial (15 mL) e clorofórmio (10 mL), com uma solução de iodeto de potássio (1 mL). Após dissolução dos reagentes, tapou-se o matraz, e colocou-se no escuro durante 5 minutos à temperatura ambiente. Por último, acrescentaram-se 75 mL de água destilada, uma solução de amido (1g/100mL) como indicador e titulou-se o iodo libertado com uma solução padrão de tiosulfato de sódio 0,01 N. Para cada sessão laboratorial foi realizado um ensaio em branco. Os valores de índice de peróxido foram calculados segundo a fórmula:

$$\text{Índice de Peróxido (mEq. O}_2\text{/kg)} = \frac{V \times N \times 1000}{m}$$

onde:

V - volume de tiosulfato de sódio gasto na titulação, tendo em conta o ensaio do branco;

N - normalidade exata da solução de tiosulfato de sódio;

m - massa da amostra em grama.

3.7.3. *Espectrofotometria no Ultravioleta*

A análise da absorvância no ultravioleta foi efetuada segundo o anexo IX do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991, com a seguinte metodologia: aproximadamente 0,6 g de amostra foram dissolvidas em 10mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano), determinando-se em seguida, em “cuvettes” de quartzo de percurso ótico de 1cm, o coeficiente de extinção da solução nos comprimentos de onda prescritos (232 a 276nm) em relação ao iso-octano no seu estado puro. As leituras de absorvância foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ 10. Os coeficientes de extinção a 232nm, 270nm e ΔK foram calculados da seguinte forma:

$$K_{232} = \frac{A_{232}}{c \times l}$$

$$K_{270} = \frac{A_{270}}{c \times l}$$

$$\Delta K = K_{270} \frac{A_{266} + A_{274}}{2}$$

onde:

A_{232} , A_{266} , A_{270} e A_{274} são absorvâncias;

c - concentração do azeite em g / 100mL;

l - percurso ótico (1 cm).

3.3. Ácidos Gordos

A composição em ácidos gordos foi determinada de acordo com o anexo XA do Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991. Os ácidos gordos, assim como os seus ésteres metílicos, foram avaliados recorrendo à transesterificação direta a frio, com hidróxido de potássio metanólico e extração com n-heptano.

O perfil em ácidos gordos foi determinado num cromatógrafo gasoso (GLC) Chrompack, modelo CP-9001, com injetor em sistema split/splitless, com uma relação de split de 1:50, injetor com detetor de ionização por chama (FID) e amostrador automático modelo Chrompack CP-9050. A separação dos ácidos gordos foi efetuada numa coluna WCOT (Wall Coated Open Tubular) de sílica fundida com fase estacionária CP Sil-88 (100% cianopropilpolisiloxano) com as dimensões 50m x 0,25mm x 0,19µm. Foi utilizado hélio como gás de arrasto. A pressão interna era de 140kPa. As temperaturas do injetor, da coluna e do detetor eram 230°C, 185°C e 250°C, respetivamente. A recolha e o tratamento dos dados foram realizados pelo programa CP Maitre Chromatography Data System, Version 2.5 (Chrompack International B.V.).

Os resultados são expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo, calculado pela normalização interna da área do pico cromatográfico e eluído entre os ésteres mirístico, linocérico e metílico. Uma amostra controlo (Olive oil 47118, Supelco) e uma mistura padrão de éster metílico de ácido gordo (Supelco 37 FAME Mix) foram utilizados para identificação e calibração (Sigma-Aldrich®, Espanha).

3.4. Tocoferóis e Tocotrienóis

A concentração de vitamina E foi obtida por determinação do teor de tocoferóis e tocotrienóis por cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), segundo a norma ISO 9936:2006.

Os padrões de tocoferóis e tocotrienóis foram comprados à Calbiochem® (La Jolla, San Diego, CA, EUA) e Sigma-Aldrich® (Espanha), ao passo que o padrão interno 2-metil-2-(4,8,12-trimetiltridecil)-2H-cromen-6-ol (tocol) era da Matreya Inc. (Pleasant Gap, PA, EUA).

Uma quantidade de 50 mg de azeite foi filtrado e misturado com uma quantidade apropriada de solução de padrão interno (tocol) num volume de 1,5mL de n-hexano e homogeneizado por agitação. A preparação das amostras foi realizada no escuro com tubos revestidos de folha de alumínio. A mistura foi centrifugada durante 5 min. a 13000 g (força G) e o sobrenadante analisado por HPLC.

O cromatógrafo consistia num sistema integrado Jasco (Japão), equipado com uma unidade de dados Jasco LC-NetII/ADC, uma bomba inteligente PU-1580, uma unidade de gradiente quaternária LG-1580-04, um desgaseificador DG-1580-54 Four line, e um detetor de fluorescência FP-920 ($\lambda_{exc} = 290\text{nm}$ e $\lambda_{em} = 330\text{nm}$). A separação cromatográfica foi conseguida através de uma coluna Supelcosil™ LC-SI ($3\mu\text{m}$) $75 \times 3,0\text{mm}$ (Supelco, Bellefonte, PA, EUA), operando à temperatura ambiente (23°C). Uma mistura de n-hexano e 1,4-dioxano (97,5:2,5) foi utilizada como eluente num caudal de $0,7\text{mL/min}$. Os dados foram analisados com o controle ChromNAV Center, JASCO Chromatography Data Station (Japão).

Os compostos foram identificados por comparação cromatográfica com padrões autênticos, por coeluição e pelo espectro de UV. A quantificação foi baseada no método do padrão interno utilizando a resposta do sinal de fluorescência.

3.5. Teor em Fenóis Totais

A composição em fenóis totais foi determinada pelo método utilizado por Capannesi et al. (2000), com algumas modificações. Para a reta de calibração preparou-se uma solução mãe de ácido cafeico de concentração 2mg/mL , onde as soluções padrão diluídas se encontravam num intervalo de concentrações de $0,04$ a $0,18\text{ mg/mL}$. Após preparação das soluções, adicionamos para tubos de 10mL , 1mL dessa solução, 1mL do reagente de Folin-Ciocalteu e 1mL de uma solução de carbonato de sódio ($7,5\%$), perfazendo-se o tubo com água desionizada. A mistura foi refrigerada durante a noite ($\approx 12\text{ h}$), após a qual foi centrifugada e efetuadas as leituras a 725nm .

Para a extração dos fenóis totais pesaram-se para cada amostra $2,5\text{g}$ de azeite, que foram dissolvidos em $2,5\text{mL}$ de n-hexano e extraídos três vezes por centrifugações de 5 min. a 5000rpm com $2,5\text{mL}$ de uma mistura de 80% de metanol e 20% de água (v/v). A cada mL de extrato adicionaram-se 1mL de Folin-Ciocalteu, 1mL de Na_2CO_3 ($7,5\%$) e perfez-se com água desionizada até ao volume de 10mL . A mistura foi refrigerada durante a noite ($\approx 12\text{h}$), após a qual foi centrifugada e efetuadas as leituras num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™ a 725nm .

3.6. Esteróis

A quantificação dos esteróis foi realizada por cromatografia gasosa com detector de ionização de chama (FID), de acordo com Cunha et al. (2006), com algumas modificações. Primeiramente, pesaram-se rigorosamente 200 mg de azeite, que foi dissolvido em n-hexano. Posteriormente foi adicionada uma alíquota do padrão interno (diidrocolesterol) e transferiu-se a solução para coluna de SPE (40 µm Bond Elut SI, Varian) pré-acondicionada com o mesmo solvente. A fração insaponificável foi eluída com etanol/éter dietílico/n-hexano (50:25:25 v/v) e levada à secagem, em corrente de azoto, a 60 °C. Procedeu-se à saponificação com 2,5 mL de KOH (1M, etanol 96 %) a 70 °C durante 30 min., em seguida procedeu-se a extração com éter dietílico. O extrato foi novamente submetido a secagem nas condições referidas e procedeu-se à derivatização com BSTFA (1% TMCS) e piridina a 70 °C durante 20 min, posteriormente agitou-se vigorosamente durante 10 segundos. A cromatografia gasosa com detecção de FID foi realizada no equipamento trace GC da Thermo Finnigan. A separação foi efetuada em coluna capilar DB- 5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, USA) com 30 m × 0,25 mm i.d. (0,25 µm). O injetor e detector foram programados para 320 °C e a temperatura do forno variou de 250 °C a 300 °C, com rampa de 2 °C/min. Utilizou-se como gás de arraste o gás hélio a uma pressão interna de 100 kPa. As amostras foram injetadas com uma razão de split de 1:50 e volumes de 1 µL. A identificação dos esteróis foi realizada por comparação dos tempos de retenção com padrões comerciais. Reporta-se a quantidade relativa de esteróis em mg/ 200g identificados, bem como o seu teor total, com base no padrão interno utilizado e assumindo resposta similar no detector utilizado.

3.7. Atividade Sequestradora de Radicais Livres

3.7.1. Atividade Sequestradora do Radical DPPH (DPPH')

Para a avaliação da atividade sequestradora recorreu-se ao radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo) que foi monitorizado de acordo com a metodologia descrita por Hatano et al. (1988). O DPPH, na nomenclatura IUPAC chamado de di(phenyl)-(2,4,6-trinitrophenyl)iminoazanium, é um radical livre estável que aceita um eletrão ou um radical de hidrogénio para se tornar uma molécula diamagnética estável e, desta forma, reduzido na presença de um antioxidante.

Para a avaliação da atividade antioxidante várias concentrações de amostras de extratos (0,3mL) foram misturados com 2,7mL de solução metanólica contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L). A mistura foi agitada vigorosamente e deixou-se repousar no escuro até obtenção de valores de absorção estáveis. A redução do radical DPPH foi medida por monitorização contínua da diminuição da absorção a 517nm.

3.7.2. Atividade Sequestradora do Radical ABTS (ABTS^{•+})

A formação do radical ABTS [2,2'-azinobis- (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)] é a base de um dos métodos espectrofotométricos que tem sido aplicado para a medição da atividade antioxidante total das soluções de substâncias puras, misturas aquosas e bebidas. Este método permite medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. O método foi descrito por Re et al. (1999), com base na capacidade de uma amostra em inibir o radical ABTS (ABTS^{•+}) em comparação com um padrão de referência antioxidante (Trolox). A reação química do ABTS^{•+} com persulfato de potássio (K₂S₂O₈) permite a formação dos radicais ABTS.

Assim, para esta técnica, o ABTS^{•+} (7mM) foi enriquecido com K₂S₂O₈ (140mM), deixando-se repousar no escuro à temperatura ambiente entre 12 a 16 horas. A solução de trabalho foi preparada com etanol até à obtenção de uma absorvância a $\lambda = 734\text{nm}$ de $0,70 \pm 0,02$. A reação realizou-se diretamente na cuvete de quartzo, com a adição de 2mL de ABTS^{•+} (Branco) e de 100 μL de amostra ou padrão. Os valores de absorvância são inversamente proporcionais à quantidade de antioxidantes presentes nas nossas amostras. As leituras foram efetuadas num espectrofotómetro UV/Visível modelo Genesys™.

Capítulo IV

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Parâmetros de qualidade

O azeite pode ser classificado em diferentes categorias comerciais de acordo com os resultados obtidos na determinação dos parâmetros de qualidade. As categorias que podem ser diretamente comercializadas ao consumidor final são o Azeite Virgem Extra e o Azeite Virgem. A qualidade de um azeite é afetada por uma sucessão de fatores, químicos, tecnológicos e sensoriais entre outros. A garantia da qualidade depende de condições executadas antes e durante o armazenamento do produto. No quadro 3 apresentam-se os valores médios obtidos para a determinação da acidez, índice de peróxido e coeficientes de absorção específica K_{232} e K_{270} , para as diferentes amostras avaliadas.

Quadro 3: Valores médios dos parâmetros de qualidade [acidez (% ácido oleico); índice de peróxido (mEq.O₂/Kg); K_{232} ; K_{270} e ΔK] do azeite (média \pm desvio padrão).

	Acidez	IP	K_{232}	K_{270}	ΔK
Quinta do Vallado	0,38 \pm 0,00	3,32 \pm 0,00	1,47 \pm 0,07	0,08 \pm 0,00	-0,003 \pm 0,001
Quinta do Noval	0,38 \pm 0,00	3,32 \pm 0,01	1,59 \pm 0,05	0,16 \pm 0,02	-0,004 \pm 0,001
Quinta do Noval Cordovil	0,28 \pm 0,00	2,49 \pm 0,01	1,20 \pm 0,06	0,10 \pm 0,01	-0,003 \pm 0,001
Real Companhia	0,37 \pm 0,00	4,14 \pm 0,00	1,25 \pm 0,14	0,09 \pm 0,01	-0,003 \pm 0,001
Vale D. Maria I	0,38 \pm 0,00	3,87 \pm 0,48	1,28 \pm 0,07	0,12 \pm 0,00	-0,004 \pm 0,000
Herdade Verdeal	0,38 \pm 0,00	2,49 \pm 0,01	1,23 \pm 0,10	0,11 \pm 0,01	-0,003 \pm 0,001
Herdade Cobra	0,38 \pm 0,00	2,49 \pm 0,01	1,94 \pm 0,40	0,17 \pm 0,02	-0,005 \pm 0,001
Herdade Madural	0,28 \pm 0,00	2,49 \pm 0,01	1,57 \pm 0,09	0,15 \pm 0,03	-0,005 \pm 0,002
João Nápoles	0,28 \pm 0,00	2,49 \pm 0,00	1,66 \pm 0,07	0,16 \pm 0,00	-0,004 \pm 0,000

A **acidez** do azeite é consequência da existência de reações de hidrólise que vão provocar rutura dos triacilgliceróis, com a consequente formação de ácidos gordos livres. Assim, a acidez é a quantificação desses ácidos gordos livres, expressa em percentagem de ácido oleico, por ser este o ácido gordo maioritário que compõe o azeite. São vários os fatores que suscitam um aumento da acidez, como sejam o ataque de pragas e doenças, como a gafa e a mosca da azeitona, a recolha de frutos do chão, a colheita demasiado tardia, o armazenamento da azeitona e sua degradação antes da extração, processos de extração do fruto mal conduzidos com tempos demasiado longos e um contato exagerado entre a água e o azeite, más condições de armazenamento entre outras.

Os valores de acidez das amostras de azeite testadas variaram entre 0,3 a 0,4% (Quadro 3), valores baixos e que permitem a classificação do azeite na categoria de azeite virgem extra de acordo com a legislação comunitária cujo valor máximo permitido para este parâmetro é de 0,8% (Regulamento Europeu n.º 1989/2003). Os baixos valores observados para este parâmetro são indicativos da boa qualidade da matéria-prima utilizada para a extração do azeite. É de referir que as amostras avaliadas são da região do Douro, onde não são conhecidos trabalhos acerca da qualidade dos azeites extraídos e das variedades de azeitona que lhe dão origem. Senso uma região onde por vezes existem condições favoráveis para o desenvolvimento de algumas doenças, como a gafa da azeitona, e pragas como a mosca da azeitona, que têm grande influência em termos de qualidade do azeite e sobretudo no aumento da acidez, os resultados obtidos são indicativo que as azeitonas que deram origem a estes azeites eram de boa qualidade e não se encontravam deterioradas.

Por outro lado é de referir também que no Douro o azeite aparece associado às grandes marcas de vinho do Porto, com nome consolidado no mercado e que têm uma grande aposta na qualidade pelo que, de uma maneira geral, os azeites que comercializam são de qualidade superior à generalidade dos azeites da região.

O **índice de peróxidos** (IP) mede o estado de oxidação primária de um azeite e é um indicador do estado inicial de deterioração. Estes produtos primários da oxidação

levam à formação do ranço, e daí a sua formação ter um impacto considerável no tempo de prateleira e na aceitação do produto pelo consumidor.

As amostras dos azeites avaliados apresentaram um índice de peróxido que variou entre 2,5 a 4,2 mEq.O₂/Kg (Quadro 3). Os valores observados foram muito baixos o que era indicativo da elevada qualidade dos azeites analisados. Assim, todas as amostras se encontravam muito abaixo do máximo estabelecido para a classificação comercial de Azeite Virgem Extra, que de acordo com o Regulamento (CE) n.º 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003 é de 20 mEq.O₂/Kg. Para o caso da denominação de origem protegida “Azeite de Trás-os-Montes”, de acordo com o seu caderno de especificações (REF.) os seus valores são ainda mais reduzidos, isto é de 15 mEq.O₂/Kg, o que também era cumprido por todas as amostras em estudo.

Os **coeficientes de extinção específica no ultravioleta K₂₃₂, K₂₇₀ e ΔK** estão relacionados com os processos de oxidação primária e secundária dos óleos vegetais e fornecem indicações acerca da sua qualidade, sobre o seu estado de conservação e sobre alterações causadas no seu processamento. Para categoria de Azeite Virgem Extra os valores de K₂₃₂ não devem ultrapassar os 2,50 enquanto que para o caso dos azeites virgens esse valor deve ser inferior a 2,60 (Regulamento Europeu n.º 1989/2003). Já para o K₂₇₀, o seu valor não pode ultrapassar 0,22 para azeite virgem extra e 0,25 para azeite virgem, enquanto os valores de ΔK são de 0,01 (Regulamento Europeu n.º 1989/2003).

No presente trabalho, os azeites avaliados tiveram valores de K₂₃₂ compreendidos entre 1,20 e 1,94, enquanto que para o caso do K₂₇₀, os valores registados variaram entre 0,08 e 0,17, estando os valores do ΔK se encontram normais para azeites de elevada qualidade. Os valores observados estão todos dentro do admissível para a categoria de azeite virgem extra de acordo com o regulamento europeu (Regulamento (CE) n.º 1989/2003) e também poderiam ser classificados de DOP de “Azeite de Trás-os-Montes” uma vez que se encontram abaixo dos máximos estabelecidos.

4.2. COMPOSIÇÃO DOS ÁCIDOS GORDOS

O perfil em ácidos gordos dos óleos vegetais é um parâmetro de particular importância uma vez que é considerado um critério de pureza de um óleo vegetal. No caso dos azeites, a análise da composição em ácidos gordos faz parte dos critérios obrigatórios para a avaliação da sua pureza e genuinidade (REG.). O perfil em ácidos gordos, e a relação entre os diferentes ácidos gordos, é variável de espécie para espécie, e dentro da espécie alguns fatores como a variedade, o local de produção, a época de colheita são fatores que fazem variar este parâmetro.

Para as amostras de azeites da região do Douro avaliadas no presente trabalho o perfil em ácidos gordos apresenta-se no quadro 4. Como seria de esperar, o ácido oleico (C18:1n9) foi o ácido gordo maioritário com valores sempre superiores a 70% do total de ácidos gordos. A amostra em que o seu teor foi superior foi na Herdade Verdeal, com 79,69%, enquanto que o valor mais baixo foi observado na amostra Herdade Madural, com 72,22% (Quadro 4). O que estará relacionado com a variedade de onde foram extraídos os azeites, uma vez que o primeiro foi um azeite extraído da variedade Verdeal, que é caracterizada por ter um elevado teor em ácido oleico, próximo dos 80%, enquanto na Madural, a variedade da qual foi extraído o azeite com o teor inferior de ácido oleico, é caracterizada por ser uma das que apresenta um teor mais baixo de ácido oleico, a rondar os 70% (Regulamento Europeu n.º 1989/2003).

O ácido gordo detetado em maior quantidade foi o ácido palmítico (C16:0) (Quadro 4). Os valores observados para o ácido palmítico variaram entre 10,58%, na amostra Herdade Verdeal, e os 12,74%, na amostra de azeite Vale D. Maria I. Para este ácido gordo os valores observados foram muito constantes observando-se apenas cerca de 2% de variação entre o teor máximo e mínimo. O ácido linolénico (C18:2cc) ocupou a terceira posição em termos de abundância, com valores entre o máximo de 11,14% registado no azeite Herdade Madural, e o mínimo de 4,15% observado no azeite Herdade Verdeal, mais uma vez esta variação estará associada à variedade do qual os diferentes azeites foram extraídos. Neste parâmetro a variação foi muito grande, cerca de 7%, o que pode ser indicativo que este ácido gordo terá potencialidades na

discriminação dos azeites das diferentes localidades do Douro. O ácido esteárico (C18:0) foi o quarto em ordem de abundância, estando os seus valores compreendidos entre os 2,58% (Azeite João Nápoles) e os 4,22% (Azeite Herdade Cobra). Os restantes ácidos gordos aparecem em quantidades sempre inferiores a 1%.

É de realçar que os valores observados para os azeites do Douro extraídos de azeitonas de uma única variedade (Cordovil, Cobrançosa, Madural e Verdeal) apresentam uma composição característica semelhante, apenas com pequenas variações, aos azeites produzidos na região de Trás-os-Montes, apesar das características edafoclimáticas distintas.

Quadro 4: Perfil em ácidos gordos, em percentagem média \pm desvio padrão, das diferentes amostras de azeites avaliadas.

	C16:0	C16:1n9	C17:0	C17:1	C18:0	C18:1n9	C18:2cc	C20:0	C20:1n9	C18:3n3	C22:0
Quinta do Vallado	10,73 \pm 0,39	0,83 \pm 0,01	0,15 \pm 0,00	0,23 \pm 0,01	2,76 \pm 0,05	76,63 \pm 0,27	6,74 \pm 0,13	0,43 \pm 0,01	0,79 \pm 0,03	0,34 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01
Quinta do Noval	12,47 \pm 0,28	0,74 \pm 0,02	0,14 \pm 0,00	0,19 \pm 0,01	2,90 \pm 0,06	72,36 \pm 0,51	9,16 \pm 0,26	0,45 \pm 0,01	1,00 \pm 0,02	0,32 \pm 0,00	0,13 \pm 0,01
Quinta do Noval Cordovil	10,66 \pm 0,10	0,54 \pm 0,06	0,08 \pm 0,01	0,11 \pm 0,00	2,69 \pm 0,02	73,73 \pm 0,09	10,33 \pm 0,06	0,39 \pm 0,01	0,95 \pm 0,01	0,32 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01
Real Companhia	10,87 \pm 0,12	0,11 \pm 0,00	0,12 \pm 0,00	0,17 \pm 0,00	2,76 \pm 0,05	74,70 \pm 0,22	9,50 \pm 0,10	0,40 \pm 0,00	0,85 \pm 0,02	0,32 \pm 0,01	0,10 \pm 0,03
Vale D. Maria I	12,74 \pm 0,14	0,11 \pm 0,01	0,10 \pm 0,01	0,17 \pm 0,01	2,74 \pm 0,08	74,79 \pm 0,23	8,06 \pm 0,03	0,40 \pm 0,02	0,91 \pm 0,03	0,30 \pm 0,01	0,12 \pm 0,00
Herdade Verdeal	10,58 \pm 0,15	0,10 \pm 0,00	0,21 \pm 0,00	0,31 \pm 0,00	3,19 \pm 0,03	79,69 \pm 0,27	4,15 \pm 0,07	0,50 \pm 0,01	0,69 \pm 0,01	0,30 \pm 0,01	0,14 \pm 0,00
Herdade Cobra	12,11 \pm 0,21	0,81 \pm 0,01	0,19 \pm 0,01	0,28 \pm 0,03	4,22 \pm 0,15	73,77 \pm 0,17	6,92 \pm 0,24	0,46 \pm 0,02	0,76 \pm 0,02	0,27 \pm 0,04	0,11 \pm 0,00
Herdade Madural	11,03 \pm 0,36	0,62 \pm 0,04	0,07 \pm 0,00	0,11 \pm 0,01	2,94 \pm 0,26	72,22 \pm 0,41	11,14 \pm 0,30	0,38 \pm 0,01	0,90 \pm 0,01	0,31 \pm 0,02	0,12 \pm 0,01
João Nápoles	11,93 \pm 0,07	0,73 \pm 0,01	0,10 \pm 0,00	0,16 \pm 0,00	2,58 \pm 0,06	76,42 \pm 0,18	6,34 \pm 0,07	0,43 \pm 0,02	0,79 \pm 0,00	0,28 \pm 0,01	0,13 \pm 0,01

Ao agrupar os ácidos gordos de acordo com as suas diferentes frações, em saturados, monoinsaturados e polinsaturados, verificou-se que os ácidos gordos saturados (SFA), cuja representação gráfica do seu teor pode ser observada na figura 11, variaram entre o máximo de $17,17 \pm 0,10\%$, na amostra Herdade Cobra, e o mínimo de $14,02 \pm 0,11\%$, amostra Quinta do Noval Cordovil. Na maioria das amostras o teor observado andou na casa dos 14%.

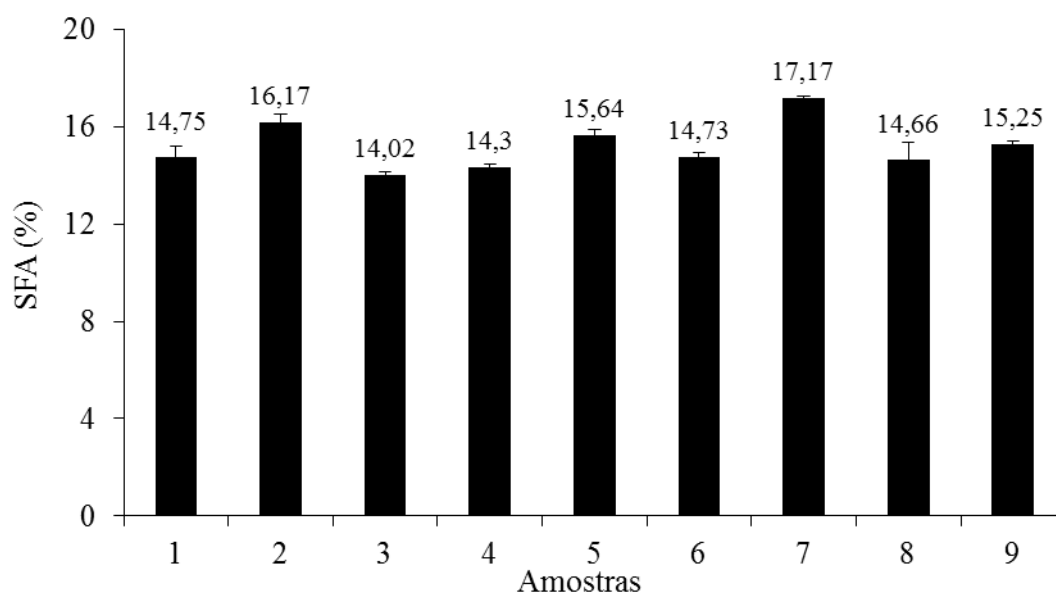


Figura 11 - Valores médios do perfil em ácidos gordos saturados das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

O somatório dos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) (Figura 12), variou entre $73,87 \pm 0,39\%$, na amostra Herdade Madural, e os $80,8 \pm 0,28\%$, na amostra Herdade Verdeal. O teor em ácidos gordos monoinsaturados está coincidente com o teor observado em ácido oleico onde também foi obtido o maior e menos valor respetivamente nessas amostras. Tal como referido anteriormente os valores observados estarão relacionados com a variedade de azeitona que deu origem a estes azeites, nomeadamente a Verdeal e a Madural. Nas restantes amostras os teores em MUFA andaram à volta dos 75%.

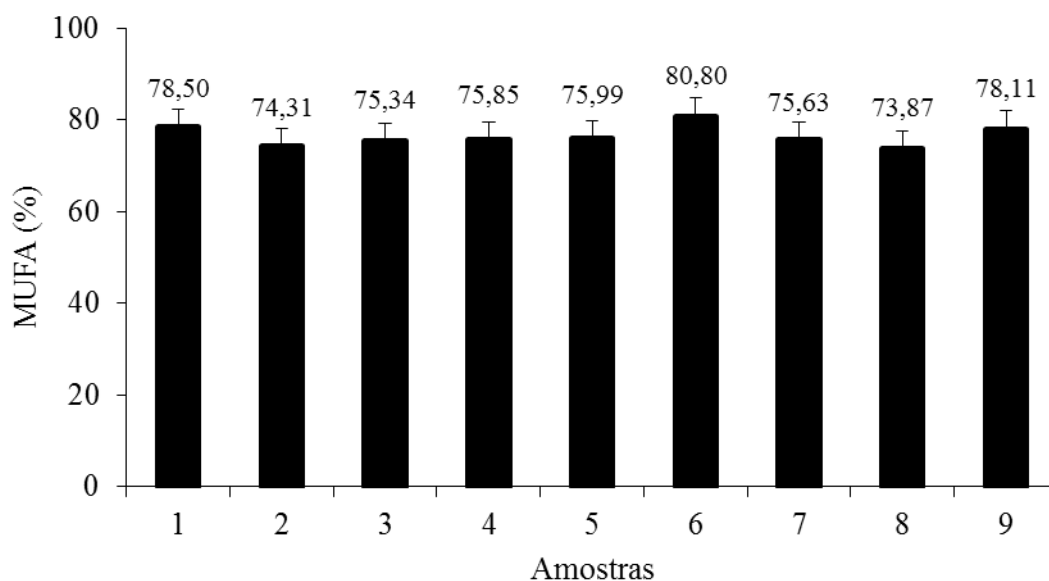


Figura 12 - Valores médios do perfil em ácidos gordos monoinsaturados das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

No presente trabalho os azeites analisados provenientes da região do Douro apresentaram um teor em ácidos gordos polinsaturados que oscilou entre o máximo de $11,46 \pm 0,28\%$, na amostra Herdade Madural, e o mínimo de $4,45 \pm 0,09\%$, na amostra Herdade Verdeal (Figura 13). Os restantes azeites apresentaram valores distintos a oscilar entre o teor máximo e teor mínimo. Os azeites com maior teor nestes ácidos gordos poderão ser mais suscetíveis à oxidação uma vez que a existência de ligações duplas e triplas favorece o processo oxidativo caso esses azeites não estejam devidamente protegidos.

Ao Analisar a relação MUFA + PUFA / SFA, verifica-se que os valores observados para os diferentes azeites são muito semelhantes, o que será indicativo de um comportamento similar em condições de oxidação. Os valores superiores para esta relação foram obtidos para as amostras de Quinta do Noval Cordovil (6,1) e Real Companhia (6,0), e os menores foram observados para as amostras Quinta do Vallado e

Herdade Cobra, ambas com 4,8. As restantes amostras isto é Quinta do Noval (5,2), Vale D. Maria (5,4), Herdade Verdeal (5,8), herdade Madural (5,8) e João Nápoles (5,6) apresentaram valores intermédios.

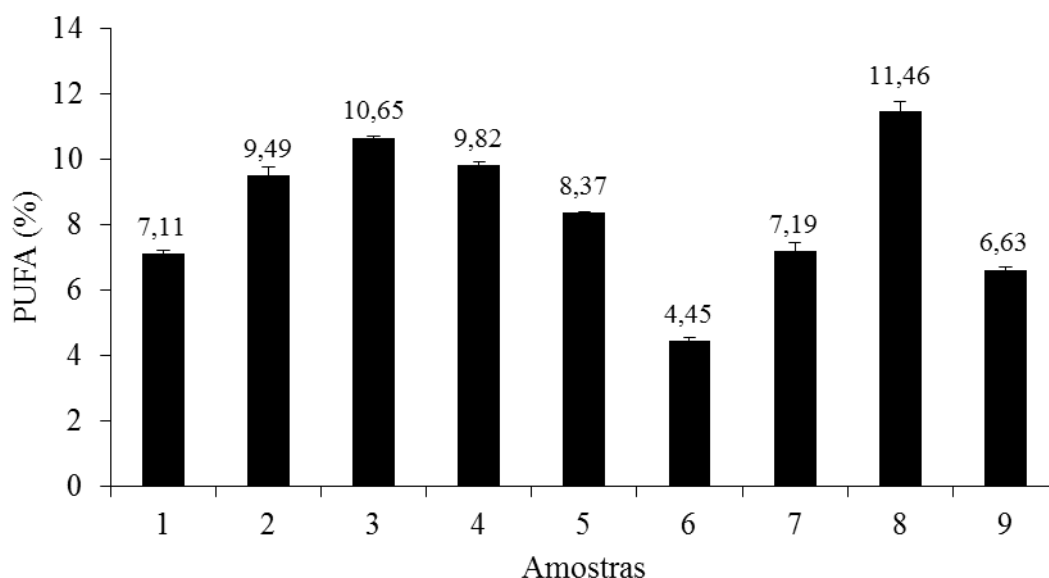


Figura 13 - Valores médios do perfil em ácidos gordos polinsaturados das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

4.3. COMPOSIÇÃO EM TOCOFERÓIS

Nas amostras avaliadas foram detetados e quantificados α , β e γ - tocoferol. Estes compostos são considerados um dos responsáveis pela atividade antioxidante do azeite e por algumas das suas propriedades biológicas. No quadro 5 apresentam-se os valores médios para os diferentes isómeros avaliados. Em todas as amostras o α -tocoferol foi o tocoferol maioritário representando mais de 93% do teor total de tocoferóis encontrado nos azeites. O azeite onde os seus teores foram superiores foi no azeite Vale D. Maria I, com 625,07 mg/kg, enquanto que o menor valor foi registado para o azeite Herdade

Verdeal, com 413,14 mg/kg. Os restantes tocoferóis detetados, isto é β -tocoferol e γ -tocoferol, foram observados em quantidades muito inferiores.

Quadro 5: Valores médios do teor em tocoferóis, expressos em mg/kg de azeite, das amostras de azeite provenientes da região do Douro (média \pm desvio padrão).

	α -Tocoferol	β -Tocoferol	γ -Tocoferol
Quinta do Vallado	418,07 \pm 25,75	9,16 \pm 0,54	2,01 \pm 0,53
Quinta do Noval	527,23 \pm 15,97	8,13 \pm 0,48	21,90 \pm 2,89
Quinta do Noval Cordovil	453,76 \pm 96,69	8,55 \pm 0,36	21,56 \pm 3,97
Real Companhia	438,21 \pm 14,09	8,22 \pm 0,28	21,16 \pm 0,64
Vale D. Maria I	625,07 \pm 126,22	9,48 \pm 0,71	21,16 \pm 0,64
Herdade Verdeal	413,14 \pm 50,12	8,10 \pm 0,51	20,67 \pm 1,93
Herdade Cobra	549,15 \pm 17,85	8,17 \pm 0,22	26,85 \pm 2,83
Herdade Madural	553,61 \pm 18,27	8,81 \pm 0,80	26,36 \pm 0,46
João Nápoles	404,65 \pm 28,68	9,15 \pm 0,35	20,26 \pm 0,74

No presente trabalho o teor total em tocoferóis, que pode ser observado na figura 14, foi na generalidade das amostras, superior ao verificado para azeites de outras regiões, onde os seu teores oscilam entre os 200 e os 400 mg/kg (Pereira et al., 2002; Benitez-Sánchez et al., 2003; Beltrán et al., 2005) o que poderá estar relacionado com o local de produção das azeitonas que lhe deram origem e que favoreça a biossíntese destes compostos.

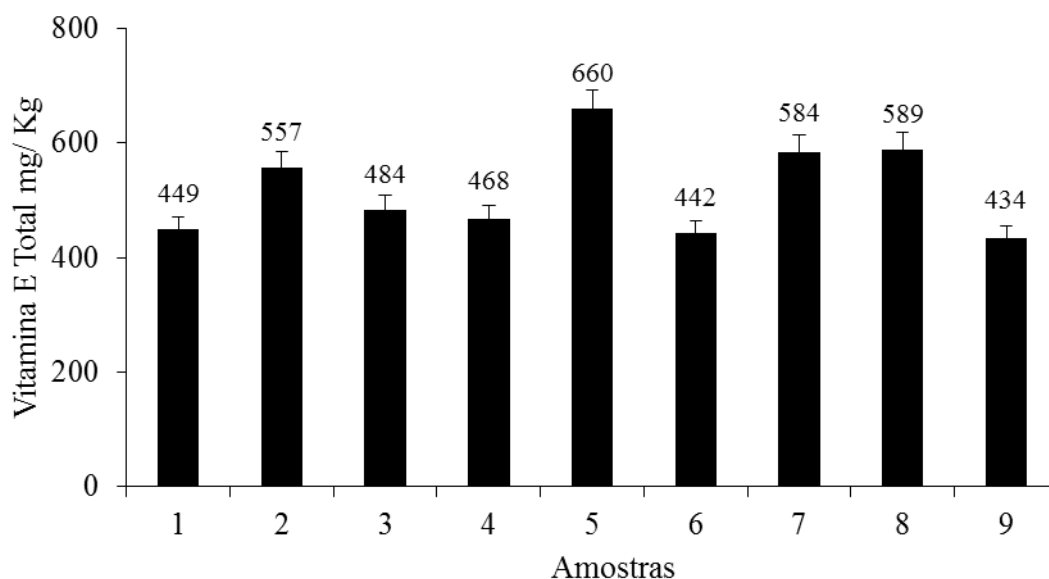


Figura 14 - Valores médios do teor total em tocoferóis (Vitamina E Total), em mg/Kg, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

4.4. TEOR EM FENÓIS TOTAIS

A composição fenólica do azeite é um aspeto de particular importância uma vez que o seu teor está relacionado com a resistência do azeite à oxidação. Um elevado teor nestes compostos pode ser indicativo de uma maior resistência à oxidação e consequentemente de um maior tempo de prateleira, uma vez que são capazes de inibir a oxidação de moléculas e eliminar radicais livres aumentando a estabilidade do produto alimentar ao longo do seu tempo de conservação. A composição fenólica tem também grande importância ao nível sensorial, visto serem este grupo de compostos os responsáveis por algumas características importantes do ponto de vista sensorial como sejam o amargo e o picante. Segundo Garcia et al. (2002) os teores de fenóis variam de 50 a 500 mg/Kg de azeite. O teor em fenóis totais das amostras de azeite avaliadas encontra-se na figura 15.

Com a exceção do azeite da Quinta do Noval, onde foram quantificados 249 mg CAE/kg de azeite, os azeites avaliados não ultrapassaram os 163 mg CAE/kg de azeite, havendo mesmo uma amostra em que não chegou Às 100 mg de CAE/kg de azeite (Real Companhia Velha). Os teores observados são baixos comparativamente com o descrito na bibliografia para azeites da região de Trás-os-Montes ou azeites provenientes de outras regiões. Este baixo teor poderá estar relacionado com o grau de maturação das azeitonas de onde foram extraídos. Os azeites da região do Douro são em geral azeites doces, que são classificados na categoria de maduros, em geral pouco amargos e picantes o que pode justificar os baixos teores encontrados. Neste sentido, os azeites analisados deverão ter um poder de conservação não muito longo pelo que devem ser consumidos o mais jovens possível.

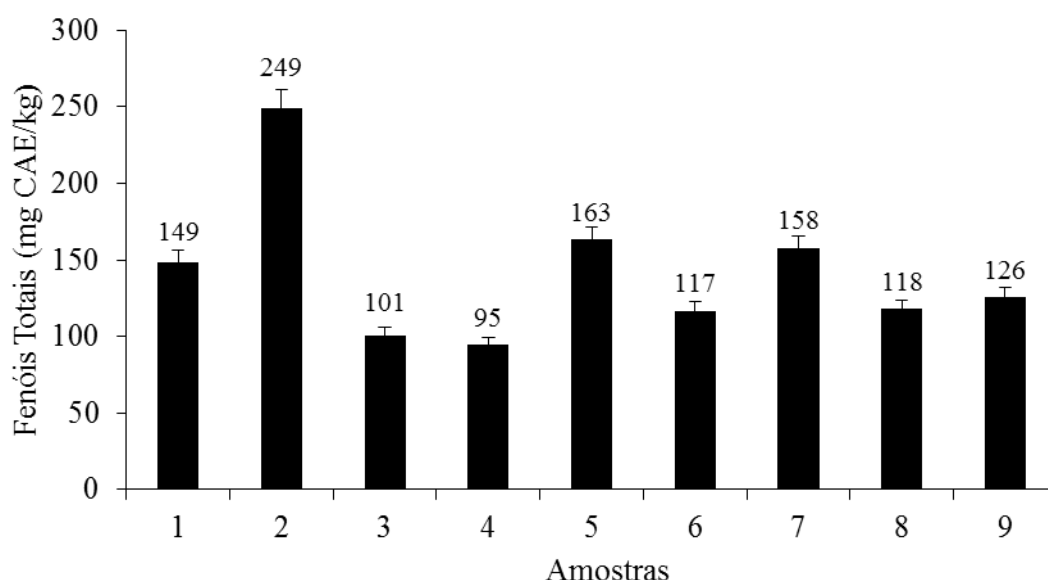


Figura 15 - Valores médios do teor em fenóis totais, em mg CAE/Kg de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

4.5. ATIVIDADE SEQUESTRADORA DE RADICAIS LIVRES

4.5.1. Atividade sequestradora do radical DPPH (DPPH•)

Na figura 16 apresentam-se os resultados obtidos para o ensaio de atividade sequestradora de radical de 2,2-difenil-1-picrilhidrazilo (DPPH•). Os melhores resultados foram obtidos para o azeite Herdade Cobra, com uma atividade sequestradora de 90,4 % de azeite, enquanto os piores resultados se registaram para o azeite proveniente da Quinta do Vallado, com 50,2 % de azeite. O fato de os melhores resultados terem sido obtidos para os azeites da Quinta do Noval, Vale de D. Maria 1 e Herdade Cobra, estarão certamente relacionados com o teor de tocoferóis e fenóis totais observados nestas amostras. De uma maneira geral os valores observados seguem o padrão dos fenóis totais e tocoferóis. Amostras com teor mais elevado nestes compostos apresentam maior capacidade sequestradora de radicais DPPH, contudo apenas se observou uma relação de dependência significativa entre o teor total de tocoferóis e o valor de DPPH observado ($p = 0,024$) enquanto que para o teor em fenóis totais não apresentou significado estatístico ($p = 0,131$).

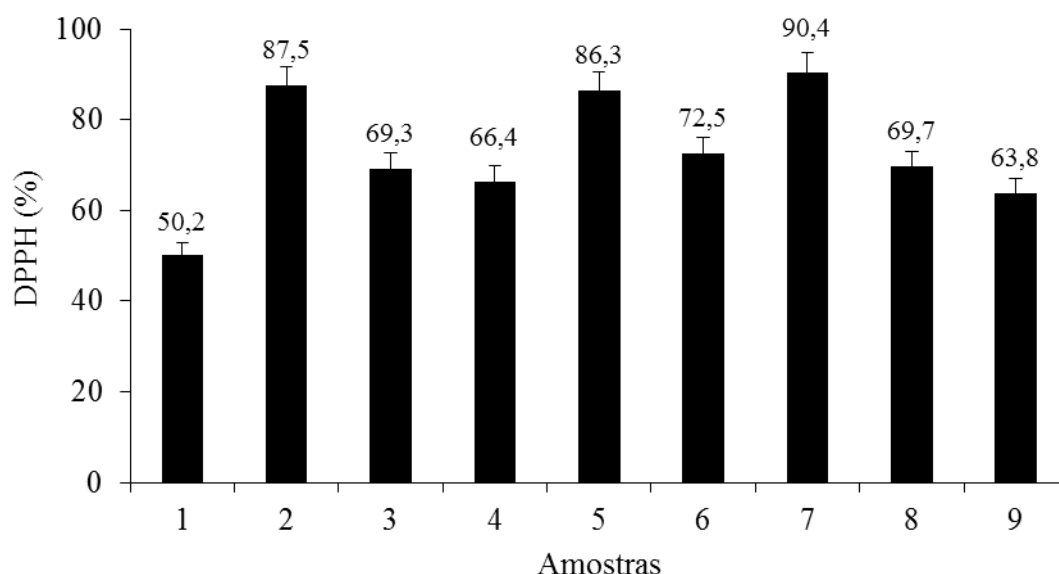


Figura 16 - Valores médios da atividade bloqueadora do radical DPPH, em % de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

4.5.2. Atividade Sequestradora do radical ABTS ($ABTS\bullet+$)

Os resultados da avaliação da capacidade de inibição o radical ABTS ($ABTS\bullet+$) em comparação com um padrão de referência antioxidante (Trolox) das diferentes amostras em estudo encontra-se na figura 17.

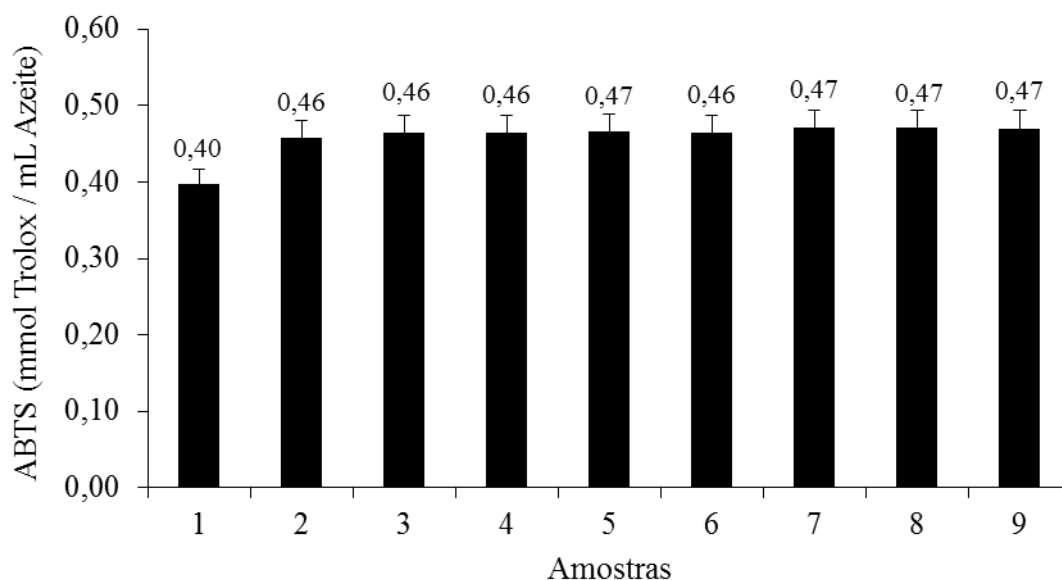


Figura 17 - Valores médios da atividade sequestradora do radical ABTS, em mg mmol Trolox/mL de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

A aplicação deste método aos azeites em estudo mostrou não ser eficaz uma vez que praticamente não foram observadas diferenças entre as amostras em estudo, variando os seus valores entre 0,40 e 0,47 mmol de Trolox/mL de azeite. Não foi observada também qualquer relação de dependência entre os valores observados e o teor em tocoferóis e fenóis totais.

4.6. AVALIAÇÃO DO PERFIL EM ESTERÓIS

O perfil em esteróis das amostras em estudo encontra-se no quadro 6. Como seria de esperar o β -sitosterol foi o esteroide mais abundante, variando o seu teor entre os 92,91% para o azeite Real Companhia e os 98,69 para o azeite João Nápoles. É de referir que de acordo com o regulamento Europeu (Regulamento Europeu n.º 1989/2003) para ser considerado azeite virgem, o teor em β -sitosterol aparente tem de ser superior a 93% do teor total de esteróis. O Campesterol foi o esteroide que surgiu em segundo lugar por ordem de abundância, variando os seus teores entre 1,88 (Real Companhia) e 6,41% (João Nápoles). Os valores obtidos para o Brassicaesterol estão ligeiramente elevados, com especial relevo para as amostras Real Companhia e Herdade Verdeal, oscilando os seus teores entre 1,11 e 1,18%, sendo o limite fixado por a Comissão Europeia de 0,1% (Regulamento Europeu n.º 1989/2003).

No que respeita aos álcoois triterpénicos eritrodiol e uvaol, os seus teores em azeites virgens devem ser inferiores a 4,5% o que se verificou na totalidade das amostras analisadas (Quadro 6). Contudo, os valores observados são superiores aos que seria de esperar para azeites virgens extra de elevada qualidade, especialmente nas amostras de Real Companhia (3,04%), Vale D. Maria 1 (3,89%), Herdade Verdeal (4,12%), e Herdade Cobra (3,33%) (Regulamento Europeu n.º 1989/2003).

Os valores médios obtidos para o teor total de esteróis encontram-se na figura 18. Os valores obtidos são inferiores ao que seria espectável para azeites virgens, cujo teor mínimo de acordo com o Regulamento Europeu n.º 1989/2003 não pode ser inferior a 1000mg/kg de azeite. Os baixos valores observados poderão estar relacionados com algum problema ocorrido durante o processo de extração dos esteróis o que provocou uma subavaliação do seu teor.

Quadro 6: Valores médios dos Esteróis Totais.

	Colesterol	Brassicasterol	Campesterol	Estigmasterol	β -Sitosterol	Δ -7-estigmasterol	Eritrodiol + Uvaol
Quinta do Vallado	$0,42 \pm 0,01$	$0,05 \pm 0,04$	$5,19 \pm 1,21$	$0,53 \pm 0,17$	$93,16 \pm 1,14$	$0,31 \pm 0,08$	$2,46 \pm 0,24$
Quinta do Noval	$0,20 \pm 0,28$	$0,14 \pm 0,01$	$1,98 \pm 2,25$	$0,58 \pm 0,56$	$96,86 \pm 0,02$	$0,25 \pm 0,08$	$2,21 \pm 0,11$
Quinta do Noval Cordovil	$0,54 \pm 0,10$	$0,08 \pm 0,00$	$5,07 \pm 0,02$	$0,33 \pm 0,11$	$93,03 \pm 0,74$	$0,29 \pm 0,10$	$2,75 \pm 0,55$
Real Companhia	$0,35 \pm 0,02$	$1,18 \pm 0,19$	$1,88 \pm 0,41$	$0,49 \pm 0,20$	$92,91 \pm 0,23$	$0,19 \pm 0,00$	$3,04 \pm 0,16$
Vale D. Maria I	ND	$0,72 \pm 0,05$	$4,63 \pm 0,21$	$0,43 \pm 0,04$	$94,00 \pm 0,40$	$0,21 \pm 0,10$	$3,89 \pm 0,55$
Herdade Verdeal	ND	$1,11 \pm 0,03$	$4,39 \pm 0,34$	$0,19 \pm 0,04$	$94,30 \pm 1,82$	$0,01 \pm 0,01$	$4,12 \pm 0,03$
Herdade Cobra	ND	$0,76 \pm 0,06$	$5,09 \pm 0,24$	$0,31 \pm 0,08$	$93,59 \pm 0,40$	$0,25 \pm 0,07$	$3,33 \pm 0,61$
Herdade Madural	ND	$0,47 \pm 0,21$	$5,55 \pm 0,90$	$0,31 \pm 0,24$	$93,47 \pm 2,03$	$0,21 \pm 0,26$	$2,51 \pm 0,99$
João Nápoles	ND	$0,34 \pm 0,01$	$6,41 \pm 0,24$	$0,47 \pm 0,04$	$98,69 \pm 0,77$	$0,35 \pm 0,11$	$3,41 \pm 0,13$

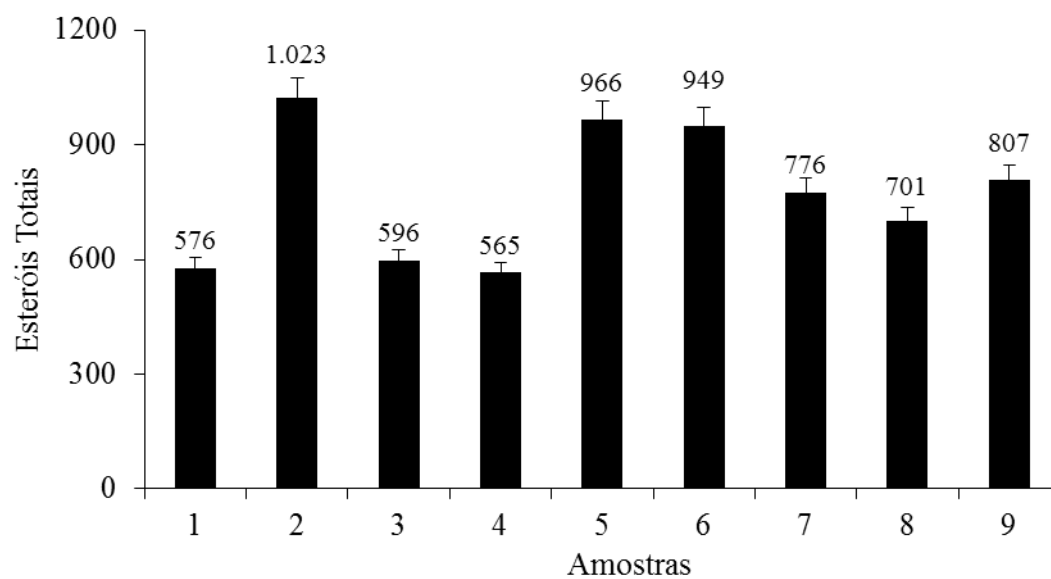


Figura 18 - Valores médios do total de esteróis, em mg/kg de azeite, das diferentes amostras de azeite do Douro avaliadas. **1.** Quinta do Vallado; **2.** Quinta do Noval; **3.** Quinta do Noval Cordovil; **4.** Real Companhia; **5.** Vale D. Maria I; **6.** Herdade Verdeal; **7.** Herdade Cobra; **8.** Herdade Madural; **9.** João Nápoles.

Capítulo V

5. CONCLUSÕES

No presente trabalho foram analisados pela primeira vez azeites provenientes da região do Douro. Os resultados obtidos pelas análises dos parâmetros de qualidade permitem afirmar que os azeites provenientes da região são de elevada qualidade, e que no geral respeitam os valores para as categorias de azeite virgem extra e azeite virgem.

Os resultados obtidos pela caracterização em ácidos gordos tocoferóis e esteróis, ainda que preliminares e que exijam a avaliação de um maior número de amostras, provenientes de toda a região e de anos de produção distintos, são importantes para a caracterização dos azeites do Douro.

Dos resultados obtidos cabe realçar o elevado teor em tocoferóis e a alta capacidade de sequestro de radicais DPPH o que é indicativo do importante valor biológico destes azeites.

Como foi referido, é importante proceder à caracterização dos azeites do ponto de vista sensorial, químico e biológico, bem como proceder ao levantamento e caracterização das variedades de oliveira que lhe dão origem para que a informação obtida possa servir de base a uma marca de certificação institucional com vista à valorização dos azeites desta região.

CAPÍTULO VI

6. BIBIOGRAFIA

- Aparício, R., Hardwood, J. (2003) Manual del aceite de olive. Ediciones Mundi-Prensa Madrid.
- Belitz, H.D., Grosch, W. Shieberle, P. (2004) Food Chemistry, (3th Edition), Springer-Verlag, Alemanha.
- Belitz, H.D., Grosch, W. Shieberle, P. (Eds.). (2009) *Food Chemistry*, (4th Edition), Berlin, Heidelberg; Springer Berlin, Heidelberg.
- Beltrán, G., Aguilera, M.P., Rio, C.D., Sanchez, S., Martinez, L., Influence of fruit ripening process on the natural antioxidante content of Hojiblanca virgin olive oils, *Food Chem.*, 89,207 (2005).
- Benitez-Sánchez, P.L., Camacho-L, M., Aparício, R.A., Comprehensive study of hazelnut oil composition with comparison to other vegetable oils, particulary olive oil EUR *Food Res. Technol.*, 218, 13 (2003).
- Boskou, D. (1996) - Olive Oil: *Chemistry and Technology* (Boskou, D., Vol. 41, pp. 101-120). Champaign: AOCS Press.
- Boskou, D. (1998) – Química y tecnología del aceite de olive. AMV editions, Mundi-Prensa. Madrid.
- Boskou, D. (2008) - Phenolic Compounds in Olives and Olive Oil. In D. Boskou (Ed.), *Olive Oil: Minor Constituents and Health* (pp. 11-44). CRC Press.
- Boskou, D., Blekas, G., & Tsimidou, M. (2006) - Olive Oil Composition. *Olive Oil Chemistry and Technology* (Second Edi., pp. 41-76). AOCS Publishing.
- Calabrese,G. (2002). Efectos del Aceite Virgen Extra Beneficiosos para la Salud. *Olivae, revista do Conselho Oleícola Internacional*, Madrid, nº 93: 19-20
- Capannesi, C., Palchetti, I., & Mascini, M. (2000). Electrochemical sensor and biosensor for polyphenols detection in olive oils. *Food Chemistry*, 71, 553-562.
- Conde, C., Delrot, S. and Gerós, H. (2008) Physiological, biochemical and molecular changes occurring during olive developmentand ripening. *J. Plant Physiol.* 165 1545-1562.

- COI – International Olive Council. Trade Standard Applying to Olive Oils and Olive-pomace Oils. COI / T.15 / NC nº 3 / Rev. 3, November 2008
- Cunha, S., Oliveira, M.B. (2006) Discrimination of vegetable oils by triacylglycerols evaluation of profile using HPLC/ELSD, *Food Chemistry*, 95, 518-524
- E.L. De Lacroix (Ed.). (2003) - European Commission, Directorate-General for Agriculture, “*The olive oil sector in the European Union*”, European Commission, Directorate-General for Agriculture, p. 6.
- Firestone, D. (2005). Olive Oil. In F.Shahidi (Ed.), *Bailey’s Industrial Oil and Fat Products*, Volumes 1-6 (6th Edition, pp. 303-331). John Wiley & Sons.
- Garcia, E., Luh, B.S., Martin, M.H.(2005) - Processing Fruits Science and Technology (Editado por Barrett, D.M., Somogyi, L., Ramaswamy, H., CRC Press, Florida, Estados Unidos), Cap.31.
- Gunstone, F. (2002) -Vegetable oils in food technology: Composition, Properties and Uses, Blackwell Publishing, 1ª Edition.
- Gutiérrez, A; Carretero, A. (2009) - El Aceite de Oliva Virgen: Tesoro de Andalucía; Fundación Unicaja, Espanha.
- Hudson B.J.F.e Ghovami, M. (1984) - Phospholipids as antioxidant synergists for tocopherols in the autoxidation of edible oils. *Lebensm. Wiss. Technol* .17:191-194.
- ISO 9936:2006, I.S. (2006). Animal and vegetable fats and oils – Determination of tocopherol and tocotrienol contents by high-performance liquid chromatography. Switzerland: ISO 2006.
- Jiménez, J.; Rondó, D.; Martínez, L., y Mataix, J. (2001) “Composición química de los aceites de oliva”, en Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario, Ed. Universidad de Granada-Puleva Food, 115-136.
- Morelló, J. R.; Motilva, M. J.; Tovar, M. J.; Romero, M. P. (2004). Changes in commercial virgin olive oil (cv Arbequina) during storage, with special emphasis on phenolic fraction. *Food Chemistry* 85, 357-364.

- Kalua, C. M.; Allen, M. S.; Bedgood Jr, D. R.; Bishop, A. G.; Prenzler, P. D. & Robards, K. (2007). *Olive oil volatile compounds, flavour development and quality: a critical review*. Rapid communication. *Food chemistry*, 100: 273-286.
- Kiritsakis, A. & Christie, W. W. (2000) - Analysis of Edible Oil. In Handbook of Olive Oil – Analysis and properties. Ed. Harwood J.; Aparicio R.; Aspen Publishers, Inc. Gaithersburg, 129-158. ISBN: 0-8342-1633-7.
- Olivicultura. ***Diagnóstico Sectorial. 2007 (MADRP)***.
- Owen, R. W.; Giacosa, A.; Hull, W. E.; Spiegelhalder, B.; Bartsh, H. (2000)- “Identification of Lignas as Major Components in the Phenolic Fraction of Olive Oil”. *Clinical Chem.*, 46, 976-988.
- Pereira, J.A., Casal, S., Bento, A., Oliveira, M.B.P.P., (2002) - Influence of olive storage period on oil quality of three portuguese cultivars of *Olea europea*, Cobrancosa, Madural, and Verdeal Transmontana, J. Agric. *Food Chem.*, 50, 6335.
- Pasqualone A, Montemurro C, Summo C, Sabetta W, Caponio F e Blanco A (2007) - Effectiveness of Microsatellite DNA Markers in Checking the Identity of Protected Designation of Origin Extra Virgin Olive Oil. *J. Agric. Food Chem.* **55**:3857-3862.
- Ramírez-Tortosa, M.C., Granados, S., & Quiles, J.L. (2006) - Chemical Composition, Types and Characteristics of Olive Oil. *Olive oil and health* (pp. 45-61). CAB International.
- Reiter, B., & Lorbeer, E. (2001) - Analysis of the wax ester fraction of olive oil and sunflower oil by gas chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 78, 881-888.
- REGULAMENTO (UE) N.º 1151/2012 do Parlamento Europeu e do Conselho de 21 de Novembro de 2012 relativo aos regimes de qualidade dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios.
- Regulamento (CE) N.º 882/2004 do Parlamento Europeu e do Conselho de 29 de Abril de 2004 relativo aos controlos oficiais realizados para assegurar a verificação do cumprimento da legislação relativa aos alimentos para animais e aos géneros alimentícios e das normas relativas à saúde e ao bem-estar dos animais.

Regulamento (CE) N.º 510/2006 do Conselho de 20 de Março de 2006 relativo à proteção das indicações geográficas e denominações de origem dos produtos agrícolas e dos géneros alimentícios.

Regulamento (CE) N.º 1989/2003 da Comissão de 6 de Novembro de 2003 relativo às características dos azeites e dos óleos de bagaço de azeitona, bem como aos métodos de análise relacionados.

Regulamento (CEE) nº 2568/91 da Comissão Europeia de 11 de Julho de 1991.

Sánchez, J.L., Carretero, A.S., & Gutiérrez, A.F. (2001) - Composición del aceite de oliva. In I. Omega 3 & F. Puleva (Eds.), *Aceite de oliva virgen: nuestro patrimonio alimentario* (pp. 195-224). Granada.

Servili, M., Selvaggini, R., Esposto, S., Taticchi, A., Montedoro, G., & Morozzi, G. (2004) - Health and sensory properties of virgin olive oil hydrophilic phenols: agronomic and technological aspects of production that affect their occurrence in the oil. *Journal of Chromatography A*, 1054, 113-127.

Tasiqula-Margari, M.; Okogeri, O. Simultaneous determination of phenolic compounds and tocopherols in virgin olive oil using HPLC and UV detection. *Food Chemistry*, 2001

Tiscornia, E., Forina, M., & Evangelisti, F. (1982) - Chemical composition of olive oil and variations induced by refining. *Rivista Italiana delle Sostanze Grasse*, 59, 519-556.

Tuck, K. L.; Hayball, P. J. (2002). Major Phenolic Compounds in Olive Oil: Metabolism and Health Effects. Review: Current Topics, *Journal of Nutrition Biochemistry*, 13: 636-644.

Visioli, F., Grande S., Bogani, P., Galli, C. (2006). Antioxidant Properties of Olive Oil Phenolics. *Olive oil and health*. CAB International.

